

安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業

「海洋生物毒生成藻類と海洋生物毒に関する研究」

令和４年度 最終年度報告書

課題番号	18064849
課題名	海洋生物毒生成藻類と海洋生物毒に関する研究

研究実施期間	平成３０年度～令和４年度（５年間）
代表機関	国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産技術研究所
研究総括者	松嶋 良次
研究総括者 連絡先	TEL : 045-788-7615
	FAX : 045-788-5001
	E-mail : matsushima_ryoji60@fra.go.jp
共同研究機関	国立大学法人 東京大学 大学院農学生命科学研究科
	国立大学法人 高知大学 教育研究部自然科学系農学部門
	一般社団法人トロピカルテクノプラス

＜別紙様式３＞最終年度報告書

１ 研究目的

水産食品を原因とする食中毒を引き起こす海洋生物毒のうち、アザスピロ酸食中毒およびシガテラ魚類食中毒は、国内でその原因毒成分が二枚貝や魚類から検出されているものの、原因毒を生産する微細藻株については分離株がほとんど分離されていないことや、当該藻類株を用いた標準物質の製造技術が確立されていないため、国内では十分なリスク管理体制が整っていない現状がある。

このため、本研究では、

- １．（１）アザスピロ酸を生産する微細藻の培養株確立と生産毒の分析
- １．（２）アザスピロ酸標準物質製造手法の開発
- ２．（１）シガテラ魚類食中毒原因物質を生産する微細藻の分離株確立と生産毒の分析
- ２．（２）シガテラ魚類食中毒原因物質の分析手法ならびに標準物質製造手法の開発

により複数のアザスピロ酸生産藻の培養株を確立して国内分離株の毒生産を解明するとともに、培養藻体を原料としたアザスピロ酸標準物質製造手法を確立し、精製方法を標準手順書として完成することを目標とする。また、シガテラ魚類食中毒原因物質（シガトキシン類、マイトトキシシン類）生産藻の培養株も複数確立し、毒生産を明らかにする。さらに、培養した藻体を原料としてマイトトキシシンを精製する手法を確立し、標準物質とするための値付け手法を検討する。これによりマイトトキシシンの精製方法を標準手順書として完成させる。

その結果、

- １．アザスピロ酸およびシガテラ関連物質の標準物質が安定供給され十分なリスク管理が行われることで安全な水産食品の供給につながることを。

が期待される。

2 研究内容

(1) 研究課題

1) アザスピロ酸に関する研究（小課題責任者名：松嶋良次・研究機関：水産研究・教育機構）

*Azadinium*属や*Amphidoma*属などのアザスピロ酸を生産する可能性がある微細藻について、国内の複数の海域の分離源試料から分離を試みて培養株を確立し、種の同定を行うとともに株ごとの毒生産について明らかにする。また、培養株を大量に培養して得た藻体を原料として、アザスピロ酸標準物質を製造するための精製技術を確立する。精製したアザスピロ酸は値付けを行い、標準物質の製造方法を標準手順書として完成させる。

(ア) アザスピロ酸を生産する微細藻の培養株確立と生産毒の分析

アザスピロ酸生産藻の培養株確立を目指して、過去に二枚貝や海水試料からアザスピロ酸が検出された海域なども参考に国内各地の分離源から培養株の確立を試み、作成した培養株について種を同定するとともに毒生産の有無を明らかにする。分離にあたっては、なお培養株の確立は令和4年度まで5年間継続して行い、5年間のうちに複数（2株以上）のアザスピロ酸生産藻の培養株確立を目標とする。また、3種以上の異なる培地により本種を培養して毒生産の点から適した培地を選択するとともに、培養温度と毒生産の関係を明らかにして効率的な培養法を明らかにする。

(イ) アザスピロ酸標準物質製造手法の開発

既存の手法と超臨界流体抽出法の2つの方法で比較する。また精製にあたってはバッチ式とオンライン超臨界流体抽出-超臨界流体クロマトグラフィーの2方式で検討する。これらにより精製したアザスピロ酸を用いて値付けの検討を行い、最終年度までに標準物質製造手法を標準手順書として完成させる。

2) シガテラ魚類食中毒に関する研究（小課題責任者名：松嶋良次・研究機関：水産研究・教育機構）

*Gambierdiscus*属などシガテラ魚類食中毒原因物質（シガトキシン類・マイトトキシン類、以下原因物質）を生成する可能性がある微細藻について、沖縄県沿岸など食中毒発生の多い地域を中心に分離を試み、種を同定するとともに培養株を確立する。微細藻探索にあたっては、本属藻類の分離経験があり共同研究機関となっているトロピカルテクノプラスからの情報も参考とする。得られた分離株について原因物質の生産の有無を調べるために、原因物質の分析法について飛行時間型質量分析計による分析手法を開発し、これにより分離株の毒生産を明らかにする。また沖縄県に所在するトロピカルテクノプラスは海域の毒化魚について入手を担当し、得られた毒化魚を用いた原因物質の分析についても検討する。さらに、マイトトキシンを生成する分離株を大量に培養し、得られた藻体を原料として標準物質製造のための精製方法を確立する。これによりマイトトキシンの精製方法を標準手順書として完成させる。

(ア) シガテラ魚類食中毒原因物質を生産する微細藻の分離株確立と生産毒の分析

国内の沿岸域から原因物質生産藻の分離を目指し、*Gambierdiscus*属を中心に年5株以上を海域から分離して培養株を確立し、種の同定を行う。得られた培養株の毒生産を調べるため、原因物質の分析法について飛行時間型質量分析計による網羅的検出手法を開発し、分離した培養株の分析を行う。なお培養株の確立は令和4年度

まで5年間継続して行い、毎年5株以上の分離株を作成し、そのなかから原因物質を生産する培養株を検索して5年間で複数（2株以上）の原因物質生産藻の培養株を得ることを目標とする。

（イ）シガテラ魚類食中毒原因物質の分析手法ならびに標準物質製造手法の開発

シガテラ魚類食中毒原因物質を生産する藻体の培養手法について、1 L規模での培養系を確立して培養系における毒収量を明らかにするとともに、原因物質の抽出ならびに精製手法検討に必要な量の藻体を得るための培養を行う。なお、1 L培養で得られる藻体で原料として不足する場合は、さらなる培養規模の拡大を検討する。マイトトキシンの精製手法については、バッチ方式とオンライン超臨界流体抽出-超臨界流体クロマトグラフィーの二方式により検討する。マイトトキシン精製方法を標準手順書として完成させる。

（2）達成目標

アザスピロ酸を生産する*Azadinium*属などの微細藻の分離・培養株を複数（2株以上）確立し、株ごとの毒生産を明らかにする。分離株の培養に用いる培地を3種以上の培地で検討して選抜するとともに、培養温度による毒生産の違いを調べて適切な培養条件を明らかにする。また、標準品製造の原料となるアザスピロ酸生産藻を大量に培養するため10 L規模の培養系を確立する。さらに、大量培養（10 L）から得られた藻体を原料として、超臨界流体抽出の導入を検討してアザスピロ酸標準物質を製造する技術を確認し、標準手順書を完成させる。

シガテラ魚類食中毒原因物質（シガトキシン類、マイトトキシン類）を生産する微細藻についても培養株を複数（2株以上）確立して毒生産を明らかにする。原因物質の分析法については飛行時間型質量分析計による網羅的検出手法を開発する。また、分離株については1 Lの培養系を多数行い、得られた藻体から超臨界流体抽出の導入を検討してマイトトキシンを精製する技術を確認する。これによりマイトトキシンの製造方法を標準手順書として完成させる。

（3）研究開発された成果の取扱い

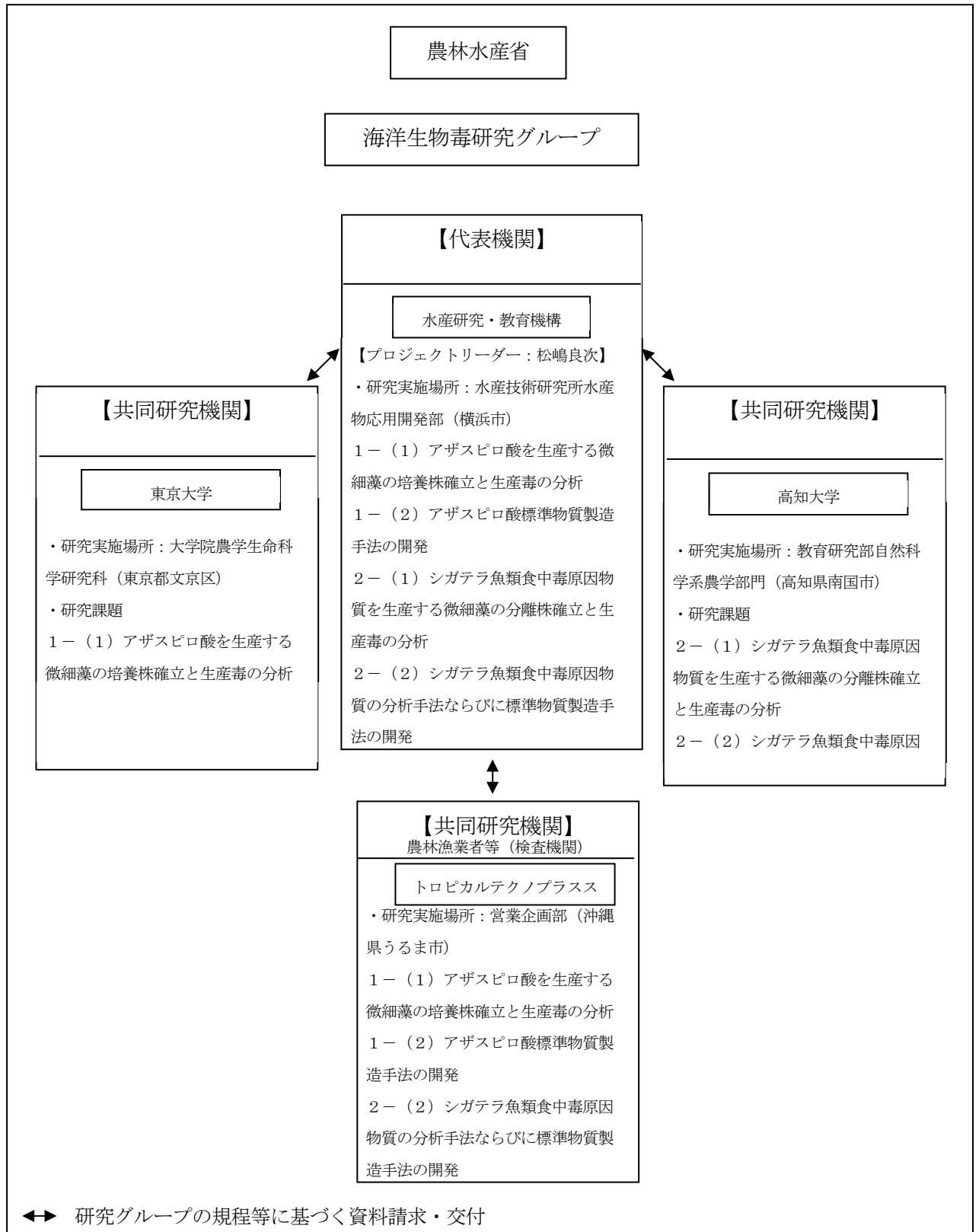
水産技術研究所では、主に都道府県や市町村の水産部局ならびに衛生部局の試験研究機関が参加する貝毒分析研修会を毎年開催しており、これまで国内の知見が乏しいアザスピロ酸やシガテラ魚類食中毒原因物質生産藻についての情報や、毒成分の分析方法について、研修会を通じて情報提供し普及していく。ただし、シガテラ魚類食中毒原因物質を生産微細藻について優れた株が得られた場合には知財化を検討する。本課題で製造できた標準物質については、必要とする試験研究機関に分与し使用してもらうことも検討するが、試薬製造企業と標準物質の製造・販売等に関する情報交換を進め、市販化の実現性が認められる物質については、新たな委託事業等への課題提案などを検討し、市販化に向けた体制作りを進める。

(4) 年次計画

研究課題	研究年度				
	3 0	3 1	R 2	R 3	R 4
1. アザスピロ酸に関する研究	アザスピロ酸生産株の培養株確立				
(1) アザスピロ酸を生産する微細藻の培養株確立と生産毒の分析	←				→
(2) アザスピロ酸標準物質製造手法の開発	←				→
2. シガテラ魚類食中毒に関する研究	シガテラ中毒原因物質生産株の培養株確立				
(1) シガテラ魚類食中毒原因物質を生産する微細藻の分離株確立と生産毒の分析	←				→
(2) シガテラ魚類食中毒原因物質の分析手法ならびに標準物質製造手法の開発	←				→

(5) 研究体制

「海洋生物毒生成藻類と海洋生物毒に関する研究」実施体制



(6) 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者	エフォート (%)
	機関	研究室		
研究総括者	水研機構水技研	水産物応用開発部 安全管理グループ	前任者及川 寛 (～2021. 3) ◎後任者松嶋良次 (2021. 4～)	20
1. アザスピロ酸に関する研究	水研機構水技研	水産物応用開発部 安全管理グループ	前任者及川 寛 (～2021. 3) ○後任者松嶋良次 (2021. 4～)	前出
(1) アザスピロ酸を生 産する微細藻の培養株 確立と生産毒の分析	東京大学	大学院農学生命科学 研究科	△ 岩滝光儀 高橋和也	5 10
	水研機構水技研	水産物応用開発部 安全管理グループ	及川 寛 (～2021. 3)	前出
			松嶋良次	前出
			渡邊龍一	10
			内田 肇	10
(2) アザスピロ酸標準 物質製造手法の開発		環境・応用部門	小澤眞由 (2021. 4～)	10
			鈴木敏之	10
	トロピカルテクノ プラス	営業企画部	吉野 敦	10
	水研機構水技研	水産物応用開発部 安全管理グループ	前任者及川 寛 (～2021. 3)	前出
			△後任者松嶋良次 (2021. 4～)	
2. シガテラ魚類食中毒に 関する研究			渡邊龍一	前出
			内田 肇	前出
			小澤眞由 (2021. 4～)	前出
		環境・応用部門	鈴木敏之	前出
	トロピカルテクノ プラス	営業企画部	吉野 敦	前出
2. シガテラ魚類食中毒に 関する研究	水研機構水技研	水産物応用開発部 安全管理グループ	前任者及川 寛 (～2021. 3) ○後任者松嶋良次 (2021. 4～)	前出

(1) シガテラ魚類食中毒原因物質を生産する微細藻の分離株確立と生産毒の分析	高知大学	教育研究部自然科学系農学部門	△ 足立真佐雄 前任者 Gaonkar Chetan Chandrakant (～2019. 3) 角野貴志 (2020. 4～ 2022. 3) 後任者 船木紘 (2022. 4～)	10
	水研機構水技研	水産物応用開発部 安全管理グループ	及川 寛 (～2021. 3) 松嶋良次 渡邊龍一 内田 肇 小澤真由 (2021. 4～) 鈴木敏之	前出
				前出
				前出
				前出
	水研機構水技研	水産物応用開発部 安全管理グループ	環境・応用部門	前出
			前任者及川 寛 (～2021. 3) △後任者松嶋良次 (2021. 4～) 渡邊龍一 内田 肇 小澤真由 (2021. 4～) 鈴木敏之	前出
			環境・応用部門	前出
				前出
(2) シガテラ魚類食中毒原因物質の分析手法ならびに標準物質製造手法の開発	トロピカルテクノ プラス	営業企画部	吉野 敦	前出
	高知大学	教育研究部自然科学系農学部門	足立真佐雄 前任者 Gaonkar Chetan Chandrakant (～2019. 3) 角野貴志 (2020. 4～ 2022. 3) 後任者 船木紘 (2022. 4～)	前出
				前出

(注1) 研究総括者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

(7) 各年度の研究費

平成30年度	10,000,000円
平成31年度	8,780,000円
令和2年度	7,639,000円
令和3年度	6,646,000円
令和4年度	5,981,000円

3 研究成果の概要

(1) 主な成果

1) 成果の内容

1. アザスピロ酸に関する研究

(1) アザスピロ酸を生産する微細藻の培養株確立と生産毒の分析

日本各地の沿岸と沖合よりアンフィドマ科渦鞭毛藻の培養株を確立した。本課題実施前に作成した2株を加え、65株の培養株を作成し、これらには*Azadinium*属の9種 (*A. cf. cuneatum*, *A. dalianense*, *A. cf. dexteroporum*, *A. poporum*, *A. spinosum*, *A. trinitatum*, *A. zhuanum*, *Azadinium* sp.1, *Azadinium* sp.2) と *Amphidoma*属の1種 (*Amphidoma cf. languida*) が含まれる。培養株が確立されたアンフィドマ科渦鞭毛藻の中では*A. poporum*が最も多く、全65株中44株となった。*A. poporum*はアンフィドマ科渦鞭毛藻の中でも主要なアザスピロ酸 (AZA) 生産種として世界的にも最も多く報告されており、本種内は5つの種内系統群 (A1, A2, B, C1, C2) に識別されている。本研究で作成できた培養株は、種内系統群A1 (9株), A2 (6株), B (13株), C1 (16株) に所属し、種内系統群C2は現在までのところ日本沿岸からは検出されていない。

これらの確立された培養株についてLC/MS/MSでAZA群を分析した結果、*A. poporum* および*A. spinosum*からAZA群を検出した。他の種についてはAZA群の産生能は認められなかった。*A. poporum*の主要な産生毒は系統群で異なる傾向がみられ、系統群A2 およびC1はAZA2を主要毒とした。系統群A2はAZA59を主要毒として産生し、系統群BはAZA2, AZA11, AZA2とAZA40, AZA36と多岐にわたるAZA群を主要毒として産生することが明らかになった。*A. spinosum*から検出されたAZA群はMS/MS分析の結果いずれも新規AZAであった。

(2) アザスピロ酸標準物質製造手法の開発

本研究で得られた*Azadinium poporum*培養株のうち高い細胞あたりの毒量を示した3株を1 Lスケールの通気培養と比較した結果、HrAz640株が既存株のhm536株より早い17日間の培養でAZA2の精製原料を得られることが明らかになった。一方でHrAz640株を10 Lスケールまで上げたところ、細胞の増殖能が低下し10 L培養でAZA2は0.5 mgの産生量となった。一方でhm536株は10 Lスケールの培養でも良好に増殖し、10 Lの培養で約0.8 mgのAZA2精製原料が得られた。

*Azadinium poporum*培養藻体(hm536株)を用いて、online-SFE-SFC装置による分離条件検討を行った。抽出と分離は、UC-Diolカラム及びMeOH(in 20mM NH₄OAc)の組み合わせで良い結果を得た。また、サンプル中の夾雑物除去のため、on-lineでの洗浄メソッドを検討し、洗浄工程と抽出工程をon-lineで可能とするため、スイッチングバルブ類を装置内に組み込み、洗浄・抽出・精製までの1ステップで可能とするメソッドも開発した。複数回抽出時でも優れた再現性を示し、本メソッドにより容易に純化できることを確認した。本法を用いて小スケールにおいて純化できたAZA2をクロマトグラム上で確認している。これにより単離までの多段階に渡る精製工程が大幅に簡略化出来る可能性が示された。条件の最適化により大量精製も可能となる。

大量培養した藻体を原料にAZA2の標準物質製造技術を確立した。含水アセトニトリルで藻体からAZA2を抽出し、冷凍することでアセトニトリル層と水層に分離した。アセトニトリル層にAZA2が含まれており、メタノール抽出やアセトン抽出と比較して大幅に水を除去できることから濃縮操作が容易であるAZA2の抽出法を確立した。次に逆相ODS固相抽出カラムに吸着させてAZA2を分画し、グラファイトカーボンで色素等を除去し、フロリジル固相抽出カラムを用いて順相条件で精製した。次に逆相ODSカラム、ゲルろ過カラムの順に分画し、最終精製に逆相ODSにイオン交換基

を混合したHPLCカラムで精製することで高純度なAZA2が得られた。最終精製のフラクション分析の結果から2.2 mgの精製原料から1.2 mgの精製物が得られており、精製効率は約50%であった。本研究で確立した*A. poporum*の培養藻体からAZA2を精製するための標準手順書を作成した。

2. シガテラ魚類食中毒に関する研究

(1) シガテラ魚類食中毒原因物質を生産する微細藻の分離株確立と生産毒の分析

CTX類・MTX類原因物質生産藻*Gambierdiscus*属の分離を目指し、沖縄県沿岸を中心として本邦沿岸域より、5年間を通じて*Gambierdiscus*属の新規培養株計60株を確立した。これら60株の18S rDNA V8-V9領域の塩基配列に基づく分子系統解析を行った結果、*G. scabrosus* 35株、*G. jejuensis* 15株、*G. silvae* 6株および*G. australes* 4株から構成されることが明らかになった。さらに、沖縄県沿岸海域ならびに高知県沿岸海域より、89種の海藻試料を採取し、これらの海藻に付着している微細藻画分から抽出したDNAを、18S rDNA V8-9領域を解析対象とするメタバーコーディングに供したところ、既報の5種/系統型に加えて、これまで本邦にて発生の報告が無い熱帯性の*Gambierdiscus caribaeus*の発生が明らかとなった。さらに、過去に世界的も報告例が無い4種の新奇種 (*Gambierdiscus* sp. Clades II-1、 II-2、 II-3、 VI) が発生することも明らかになった。

G. australes OUN220518_1F12株と同KT062821S-2株が、マイトトキシン(MTX)を生産し、前者の株はそれに加えて新規MTX類縁体も生産することが明らかとなった。新規株のMTX生産能に関して、*G. australes* OUN220518_1F12株の1細胞当たりのMTX含量は、プロジェクト開始前に既に分離されていた*G. australes* I080606株(既存株)の含量の2倍以上高かった。また、新規MTX類縁体の生産能に関しては、本プロジェクト研究にて得られた、他の*G. australes* 2株についても、その生産能が確認された。新規MTXの構造はLC/QTOF分析の結果、MTXより分子量が小さく、MS/MS分析によりMTXのC100-C142間に構造の違いがあることが推測された。

増殖の遅い*G. silvae*等の株の増殖に対して、紅藻の1種であるガラガラから抽出した脂溶性画分の添加により、*G. silvae*株と*G. scabrosus*株の両株の増殖が有意に促進された。また、*Gambierdiscus*属藻の生育と海洋細菌が関連することが明らかになった。

(2) シガテラ魚類食中毒原因物質の分析手法ならびに標準物質製造手法の開発

シガテラ魚類食中毒原因物質を生産するとされる*Gambierdiscus* 属および沖縄県沿岸から収集したシガテラ魚類中に含まれるシガトキシン群の分析条件を検討し、網羅的に*Gambierdiscus* 属が生産するシガトキシン群を検出する手法を確立し、類似した構造を持つ類縁体についても特徴的なプロダクトイオンを抽出することで、CTX群の検索が可能となった。沖縄県沿岸から収集したシガテラ魚類 (26検体) について筋肉部位と肝臓に分け、LC/MS/MSによりCTX群の分析を行ったが、高毒化した筋肉部位の試料が得られなかったため、高感度なELISA法でCTX群を分析した。CTX1B抗体反応等量で0.1 ng/g を超えた試料は筋肉部位においてイッテンフエダイ 2検体、バラフエダイ1検体であった。肝臓部位においてはバラハタ1検体、イッテンフエダイ1検体、ドクウツボ3検体であった。LC/MS/MS分析用の前処理および濃縮操作を行うことでELISAによりFDAのCTX1B基準値0.01 ng/gの低濃度試料においてもNeuro2A細胞毒性試験でCTX群の検出が可能であることが示唆された。MTXを生産する*G. australes*、CTX群抗体と反応を示す*G. silvae* および*G. scabrosus*の抽出液についてNeuro2A細胞毒性試験を実施し、*G. silvae*はCTX群と類似した活性を示した。

MTX精製原料を確保するため、MTXの生産が確認されている*G. australes*既存株を用いて培養条件を検討した。100mLフラスコ、3Lカブ型フラスコ、20Lコンテナと順

次拡大し、生育とMTXの産生を確認した。20Lコンテナを3台連結し、培地を循環させた大量培養（100 L規模）を検討した。コンテナ3連・100Lの培養では、各培養槽に $1.3 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ cellsの細胞を播種したのち6週間培養した。順調に生育した際には、回収藻体中に約6 mgのMTXが含まれていた。コンテナ1個当りのMTX収量としては、静置培養で約700 μ g、循環培養では約2mgとなった。

online-SFE-SFC装置（Nexera UC, 島津製作所）を活用してAZA分離条件をベースに、シガテラ魚類食中毒原因物質の分析ならびに標準物質製造手法を検討した。AZA精製同様にonline-SFE-SFC装置を用いた洗浄メソッドで色素や脂肪酸類の除去を行うことで、目的物純度を高められる可能性が示された。MTXを産生する *G. australes* を大量培養した藻体を原料にMTXの標準物質製造技術を確立した。*G. australes* の凍結乾燥物から二酸化炭素の超臨界流体によるMTX抽出は、をメタノールを共溶媒にしてもMTXの抽出効率が約10%以下であり、溶媒抽出が適していた。含水アセトニトリルで藻体からMTXを抽出し、冷凍することでアセトニトリル層と水層に分離した。水層にMTXが含まれ逆相ODS固相抽出カラムに吸着させてMTXを抽出した。次にDiol固相抽出カラム、フェニル固相抽出カラムで精製した。次にゲルろ過クロマトグラフィーに供し、逆相ODSカラムによるHPLC精製することで高純度なMTXが得られ、MTXを精製するための標準手順書を作成した。

2) 成果の活用

1. アザスピロ酸に関する研究

(1) アザスピロ酸を生産する微細藻の培養株確立と生産毒の分析

知見の乏しかったアザスピロ酸について、高感度一斉分析法を開発し、産生プラシントンについて、基準値が設けられている AZA2 を産生する原因藻類が広く分布することが明らかになった。モニタリング体制を構築するうえで、これらの知見は重要である。今後更に、モニタリング手法の開発や主要な二枚貝生産海域での出現状況等の情報の充実が望まれる。

(2) アザスピロ酸標準物質製造手法の開発

AZA2 の標準物質製造のための精製技術が確立された。現在市販されている AZA2 標準物質の供給が不足した場合に、作成した手順書をもとに *A. poporum* 藻体から AZA2 の精製を行い、試薬メーカー等への AZA2 の供給が可能になる。

2. シガテラ魚類食中毒に関する研究

(1) シガテラ魚類食中毒原因物質を生産する微細藻の分離株確立と生産毒の分析

国内の沿岸域から計 60 株の新規な *Gambierdiscus* 属分離株を確立し、それらを同定することにより、マイトトキシン産生株を含む *G. scabrosus* 35 株、*G. jejuensis* 15 株、*G. silvae* 6 株および *G. australes* 4 株から構成されることを明らかにした。また、*G. silvae* ISK190517M4 株の機器分析で CTX 群は検出されなかったものの、強いマウス経口毒性と CTX 群と同様の Neuro2A 細胞毒性を示した。これらの知見は、今後、国内シガテラ魚類食中毒に関する研究を進める上で重要な足かりとなる。

(2) シガテラ魚類食中毒原因物質の分析手法ならびに標準物質製造手法の開発

本研究によりシガトキシン群の一斉分析手法とマイトトキシンの精製方法が確立された。MTX の分析用標準品が必要になった場合は作成した精製手順書をもとに MTX を精製し、得られた標準物質原料について試薬メーカー等への提供を検討する。

(2) 各研究課題の成果

1) 小課題名：アザスピロ酸に関する研究

(ア) 研究目標

*Azadinium*属や*Amphidoma*属などのアザスピロ酸を生産する可能性がある微細藻について、国内の複数の海域の分離源試料から分離を試みて培養株を確立し、種の同定を行うとともに株ごとの毒生産について明らかにする。また、培養株を大量に培養して得た藻体を原料として、アザスピロ酸標準物質を製造するための精製技術を確認する。精製したアザスピロ酸は値付けを行い、標準物質の製造方法を標準手順書として完成させる。

(イ) 研究内容

(1) アザスピロ酸を生産する微細藻の培養株確立と生産毒の分析

アザスピロ酸生産藻の培養株確立を目指して、過去に二枚貝や海水試料からアザスピロ酸が検出された海域なども参考に国内各地の分離源から培養株の確立を試み、作成した培養株について種を同定するとともに毒生産の有無を明らかにする。分離にあたっては、なお培養株の確立は令和4年度まで5年間継続して行い、5年間のうちに複数（2株以上）のアザスピロ酸生産藻の培養株確立を目標とする。また、3種以上の異なる培地により本種を培養して毒生産の点から適した培地を選択するとともに、培養温度と毒生産の関係を明らかにして効率的な培養法を明らかにする。

(2) アザスピロ酸標準物質製造手法の開発

アザスピロ酸を生産する培養株を用いて、まず小規模での通気培養系を検討したのちに培養規模を10 Lまで拡大し、この培養により精製条件の検討や最終精製に必要な量の藻体を確保する。得られた藻体を用いてアザスピロ酸の抽出方法について検討するが、既存の手法と超臨界流体抽出法の二つの方法で比較する。また精製にあたってはバッチ式とオンライン超臨界流体抽出-超臨界流体クロマトグラフィーの2方式で検討する。これらにより精製したアザスピロ酸を用いて値付けの検討を行い、最終年度までに標準物質製造手法を標準手順書として完成させる。

(ウ) 研究結果

(1) アザスピロ酸を生産する微細藻の培養株確立と生産毒の分析

日本各地の沿岸と沖合より入手した海水試料からアンフィドマ科渦鞭毛藻を探索し、単離培養、分子系統解析、顕微鏡観察を行うことで、系統と形態を明らかにして同定したアンフィドマ科渦鞭毛藻の培養株を確立した。本課題実施前に作成した2株を加え、2022年度までに65株の培養株を作成し、これらには*Azadinium*属の9種 (*A. cf. cuneatum*, *A. dalianense*, *A. cf. dexteroporum*, *A. poporum*, *A. spinosum*, *A. trinitatum*, *A. zhuanum*, *Azadinium* sp.1, *Azadinium* sp.2) と*Amphidoma*属の1種 (*Amphidoma cf. languida*) が含まれる(図1)。

Azadinium類の出現海域

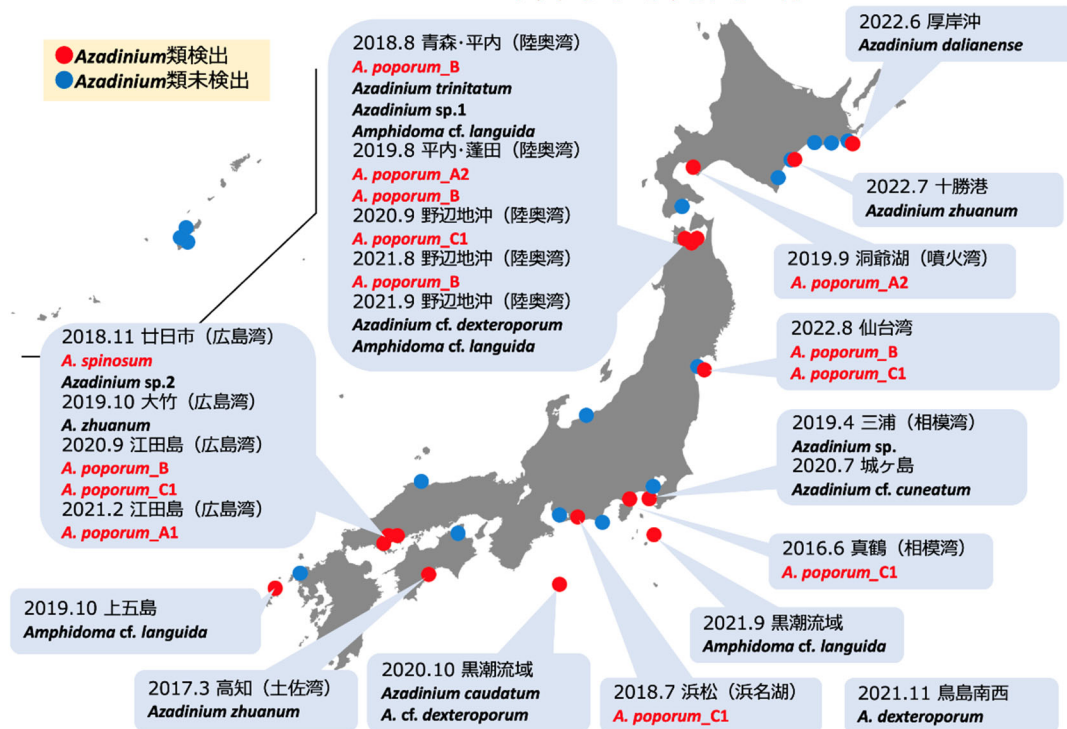


図1. *Azadinium* 類微細藻の出現海域と検出されたアザスピロ酸類

形態観察からは*Azadinium caudatum*の出現も確認したが、同種の培養株は確立されなかった。培養株が確立されたアンフィドマ科渦鞭毛藻の中では*A. poporum*が最も多く、全65株中44株となった。*A. poporum*はアンフィドマ科渦鞭毛藻の中でも主要なアザスピロ酸生産種として世界的にも最も多く報告されており、本種内には5つの種内系統群（A1, A2, B, C1, C2）に識別されている。本研究で作成できた培養株は、種内系統群A1（9株）、A2（6株）、B（13株）、C1（16株）に所属し、種内系統群C2は現在までのところ日本沿岸からは検出されていない。それぞれの種内系統群は、A1が広島湾、A2が噴火湾と陸奥湾、Bが陸奥湾、仙台湾、広島湾、C1が陸奥湾、仙台湾、相模湾、浜名湖、広島湾から分離したもので、特に系統群BとC1は日本でも太平洋岸を中心に広い分布が確認された。種同定に関しては、既記載種と系統的位置が一致したものは、*A. dalianense*, *A. poporum*, *A. spinosum*, *A. trinitatum*, *A. zhuanum*の5種で、*A. cf. cuneatum*については既報の同種系統群と姉妹群となったため同種との異同を確認するためには詳細な形態観察が必要である。*A. dexteroporum*については、1株が既報の系統群に含まれたが、2株はこの系統群と姉妹群となったため*A. cf. dexteroporum*としている。*Azadinium sp. 1*と*sp. 2*については、既報の系統群との明確な類縁が示されなかったことから未記載種であると認識している。*Amphidoma*属では*A. languida*に近縁な*A. cf. languida*が7株が陸奥湾、黒潮流域、上五島より作成された。本課題実施前には日本沿岸からはアンフィドマ科渦鞭毛藻の出現報告がなかったことから、*A. poporum*（A2, B, C1）、*A. trinitatum*, *A. zhuanum*の出現

を報告した (Takahashi et al. 2021)。また, *Azadinium* sp. 1については鎧板配列等の微細構造観察を行い, 特に腹孔の位置と頂孔板周辺の配列に既記載種との違いが見られたことから新種としての記載報告論文を投稿している (Kuwata et al. 投稿中)。

これらの確立された培養株についてLC/MS/MSでAZA群を分析した結果、*A. poporum*および*A. spinosum*からAZA群を検出した。他の種についてはAZA群の産生能は認められなかった。*A. poporum*の主要な産生毒は系統群で異なる傾向がみられ、系統群A2およびC1はAZA2を主要毒とした。系統群A2はAZA59を主要毒として産生し、系統群BはAZA2, AZA11, AZA2とAZA40, AZA36と多岐にわたるAZA群を主要毒として産生することが明らかになった。*A. spinosum*から検出されたAZA群はMS/MS分析の結果いずれも新規AZAであった。

(2) アザスピロ酸標準物質製造手法の開発

本研究で得られた*Azadinium poporum*培養株のうち高い細胞あたりの毒量を示した3株を、20℃で1/2F2海水培地1 Lスケールの通気培養で比較した結果、HrAz640株が17日間の培養でAZA2の精製原料を得られることが明らかになった (図2)。

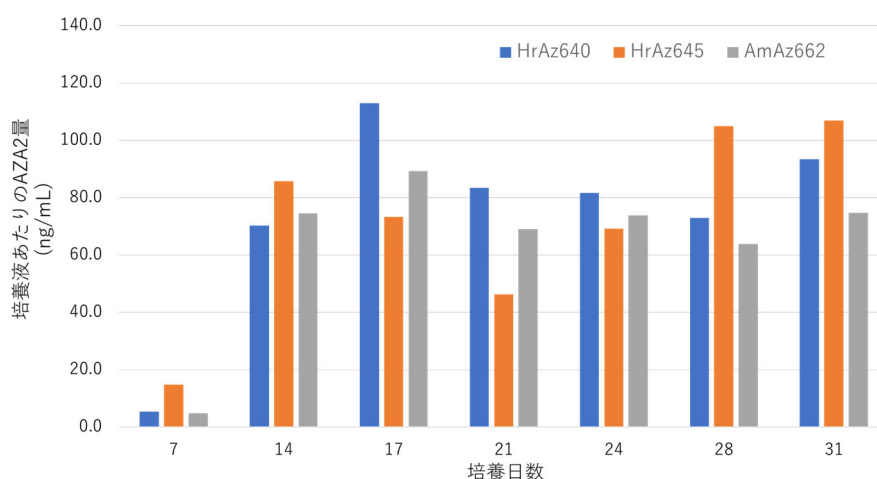


図2. AZA2生産株の1Lスケール培養におけるAZA2生産量の比較

次にHrAz640株を10 Lスケールまで上げたところ、細胞の増殖能が低下し約35日間の10 L培養でAZA2は0.5 mgの産生量となった。既存株のhm536株は10 Lスケールの培養でも良好に増殖し、35日間の10 Lの培養で約0.9 mgのAZA2精製原料が得られた (図3)。

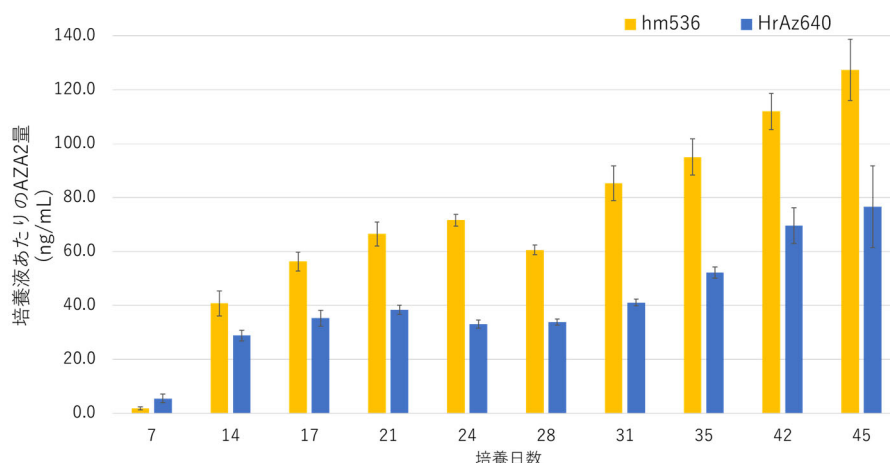


図3. 既存株hm536株と高生産株HrAz640株の10 L培養時のAZA2量

水産技術研究所で培養された*Azadinium poporum*培養藻体(hm536株)を用いて、online-SFE-SFC装置による分離条件検討を行った。抽出と分離は、UC-Diolカラム及びMeOH(in 20mM NH_4OAc)の組み合わせで良い結果を得た。また、サンプル中の夾雑物除去のため、on-lineでの洗浄メソッドを検討し、 SFCO_2 、 SFCO_2 -MeCN、Hexaneにより色素等の除去が可能であり、洗浄液にはAZA-2は殆ど認められないことをMSにより確認した。洗浄工程と抽出工程をon-lineで可能とするため、スイッチングバルブ類を装置内に組み込み、洗浄・抽出・精製までの1ステップで可能とするメソッドも開発した。

複数回抽出時でも優れた再現性を示した。抽出回数の検討では、抽出容器充填率50%(12 mg)では5回繰り返し抽出する事で完全に抽出できることが分かった。洗浄・抽出・精製までの1ステップメソッドにより、AZA-2ピーク近傍には夾雑物は少ないことをDADクロマトグラムとトータルイオンマスキングクロマトグラムより確認し、本メソッドにより容易に純化できることを確認した。本法を用いて小スケールにおいて純化できたAZA2をクロマトグラム上で確認している。これにより単離までの多段階に渡る精製工程が大幅に簡略化出来る可能性が示された。条件の最適化により大量精製も可能となる。

本法を用いた様々なサンプルパターンに応じた精製ルートも検討しており、熟練者でなくともフローに沿ってメソッド通りに実行することで生成することが可能になると想定される。

AZA2を産生する*A. poporum*を大量培養した藻体を原料にAZA2の標準物質製造技術を確立した。二酸化炭素の超臨界流体による抽出は凍結乾燥した培養藻体から共溶媒にメタノールを用いることで抽出されたが、スケールアップに伴って小型有殻渦鞭毛藻の*Azadinium*類の残渣が抽出管のフィルターを通過し、システム内に詰まるため効率的な溶媒抽出法を検討した。含水アセトニトリルで藻体からAZA2を抽出し、冷凍することでアセトニトリル層と水層に分離した。アセトニトリル層にAZA2が含まれており、メタノール抽出やアセトン抽出と比較して大幅に水を除去できることから濃縮操作が容易であるAZA2の抽出法を確立した。次に逆

相ODS固相抽出カラムに吸着させてAZA2を分画し、グラファイトカーボンで色素等を除去し、フロリジル固相抽出カラムを用いて順相条件で精製した。次に逆相ODSカラム、ゲルろ過カラムの順に分画し、最終精製に逆相ODSにイオン交換基を混合したHPLCカラムで精製することで高純度なAZA2が得られた。¹H-NMR(図4)の結果から定量NMRに使用できるピークを選定し、AZA2を定量NMRで値付けした結果0.26 mMと値付けられた。LC/PDA/QTOF分析では夾雑物のピークは検出されず、¹H-NMRのスペクトル中のAZA2と夾雑するスペクトルがわずかなことから、95%以上の純度のAZA2精製物が得られたと推測した。最終精製のフラクション分析の結果からAZA2を2.2 mg含む精製原料から1.2 mgの精製物が得られており、精製効率は約50%であった。本研究で確立した*A. poporum*の培養藻体からAZA2を精製するための標準手順書(別添1：アザスピロ酸2精製手順書)を作成した。

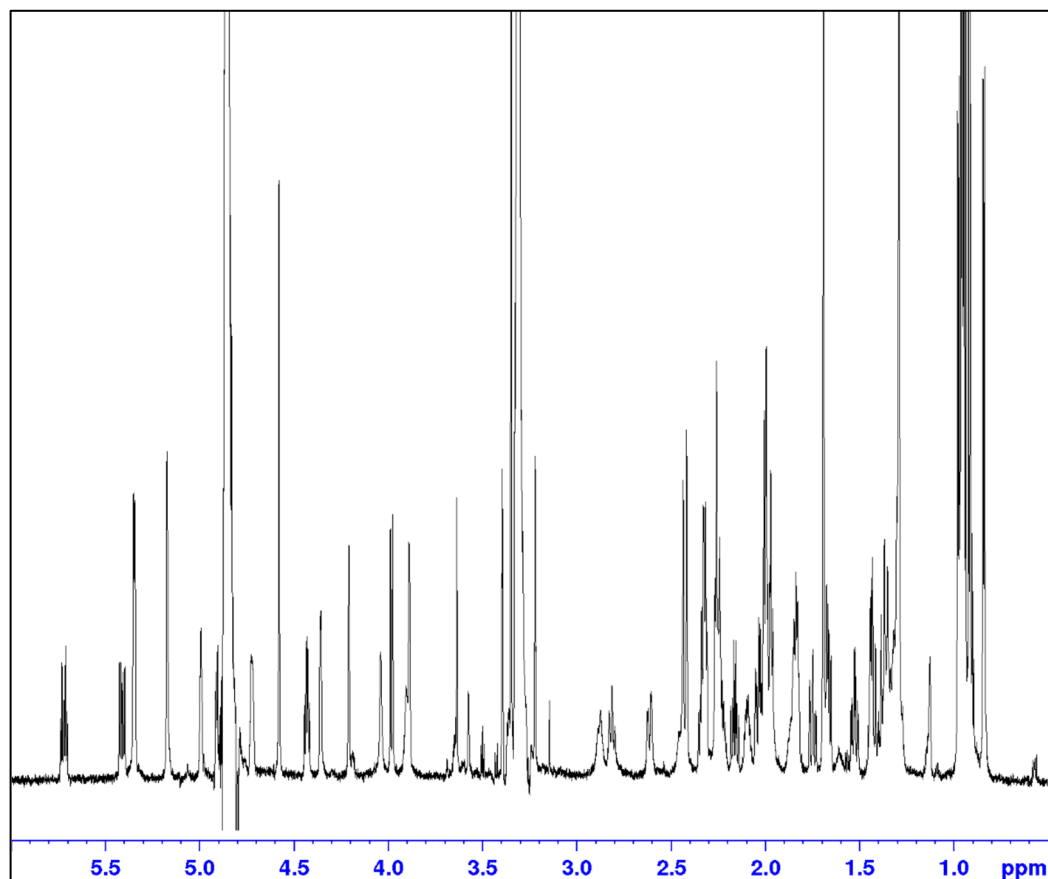


図4. 精製したAZA2の¹H-NMR スペクトル

(エ) 研究成果の活用における留意点

現時点のonline-SFE-SFC装置による自動精製では、抽出と分離において、UC-Diolカラム及びMeOH(in 20mM NH₄OAc)の組み合わせで良い結果を得ているが、今後、カラム充填剤の進歩やアプリケーションの出現も考えられ、将来に渡り本法が唯一の方法ではない。随時新しい手法を取り入れながら精製手法をアップデートする必要がある。

現在市販されているAZA2標準物質の供給が不足した場合に、作成した手順書をもとに

*A. poporum*藻体からAZA2の精製を行い、試薬メーカー等へのAZA2の供給を検討する。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

本研究により日本沿岸においても、基準値が設けられているAZA2を産生する原因藻類が広く分布することが明らかになったが、出現時期や出現密度が明らかになっておらずモニタリング体制を構築するうえで、これらの知見が必要となる。そのためには、AZA群を産生する*Azadinium*類のモニタリング手法を確立し、主要な二枚貝生産海域での詳細な出現状況を明らかにする必要がある。

開発した自動精製法は、online-SFE-SFC装置 (Nexera UC, 島津製作所) を活用しての自動精製となるため、本機に特化したメソッドや精製の実施となることが問題である。他社の超臨界流体抽出及びクロマトグラフ装置はオンラインでないものが多く、本機の手法を移管して使用することは難しいと考えられる。

AZA2の標準物質の製造技術については精製効率が約50%であり、より効率的な精製技術を確立することで標準物質の製造が容易になることが期待される。高純度化したAZA2は高濃度となるようにメタノールを添加すると一部が不溶化し、見かけ上の回収率が低下するため、NMRによる値付け時に使用する溶媒条件を検討する必要がある。

<引用文献>

なし

2) 小課題名：シガテラ魚類食中毒に関する研究

(ア) 研究目標

*Gambierdiscus*属などシガテラ魚類食中毒原因物質（シガトキシン類・マイトトキシン類、以下原因物質）を生成する可能性がある微細藻について、沖縄県沿岸など食中毒発生の多い地域を中心に分離を試み、種を同定するとともに培養株を確立する。微細藻探索にあたっては、本属藻類の分離経験があり共同研究機関となっているトロピカルテクノプラスからの情報も参考とする。得られた分離株について原因物質の生産の有無をしらべるために、原因物質の分析法について飛行時間型質量分析計による分析手法を開発し、これにより分離株の毒生産を明らかにする。また沖縄県に所在するトロピカルテクノプラスは海域の毒化魚について入手を担当し、得られた毒化魚を用いた原因物質の分析についても検討する。さらに、マイトトキシンを生成する分離株を大量に培養し、得られた藻体を原料として標準物質製造のための精製方法を確立する。これによりマイトトキシンの精製方法を標準手順書として完成させる。

(イ) 研究内容

(1) シガテラ魚類食中毒原因物質を生産する微細藻の分離株確立と生産毒の分析

国内の沿岸域から原因物質（シガトキシン類・マイトトキシン類）生産藻の分離を目指し、*Gambierdiscus*属を中心に年5株以上を海域から分離して培養株を確立し、種の同定を行う。得られた培養株の毒生産を調べるため、原因物質の分析法について飛行時間型質量分析計による網羅的検出手法を開発し、分離した培養株の分析を行う。なお培養株の確立は令和4年度まで5年間継続して行い、毎年5株以上の分離株を作成し、そのなかから原因物質を生産する培養株を検索して5年間で複数（2株以上）の原因物質生産藻の培養株を得ることを目標とする。

(2) シガテラ魚類食中毒原因物質の分析法ならびに標準物質製造手法の開発

シガテラ中毒原因物質を生産する藻体の培養手法について、1 L規模での培養系を確立して培養系における毒収量を明らかにするとともに、原因物質の抽

出ならびに精製手法検討に必要な量の藻体を得るための培養を行う。なお、1 L 培養で得られる藻体で原料として不足する場合は、さらなる培養規模の拡大を検討する。マイトトキシンの精製手法については、バッチ方式とオンライン超臨界流体抽出-超臨界流体クロマトグラフィーの二方式により検討する。マイトトキシンの精製方法を標準手順書として完成させる。

(ウ) 研究結果

(1) シガテラ魚類食中毒原因物質を生産する微細藻の分離株確立と生産毒の分析

CTX類・MTX類原因物質生産藻 *Gambierdiscus* 属の分離を目指し、原因藻が付着している可能性のある藻類の探索・採集を行った。採取は、大潮の時期を狙い、下部干潮帯のタイドプールを中心に、海藻や底砂を採取した。海藻類の採取は、ホンダワラ類やウミウチワなどの褐藻類を中心に採取した。また、各所より砂を採取し、底砂に棲息することが報告されている *Fukuyoa* 属藻の採取も目指した。サンプリングは、これまでに沖縄県内で合計30回行い、採集藻類を高知大学へ送付した。

沖縄県沿岸を中心として本邦沿岸域より、5年間を通じて *Gambierdiscus* 属の新規培養株計60株を確立した。これら60株の18S rDNA V8-V9領域の塩基配列に基づく分子系統解析を行った結果、*G. scabrosus* 35株、*G. jejuensis* 15株、*G. silvae* 6株および *G. australes* 4株から構成されることが明らかになった(図1)。

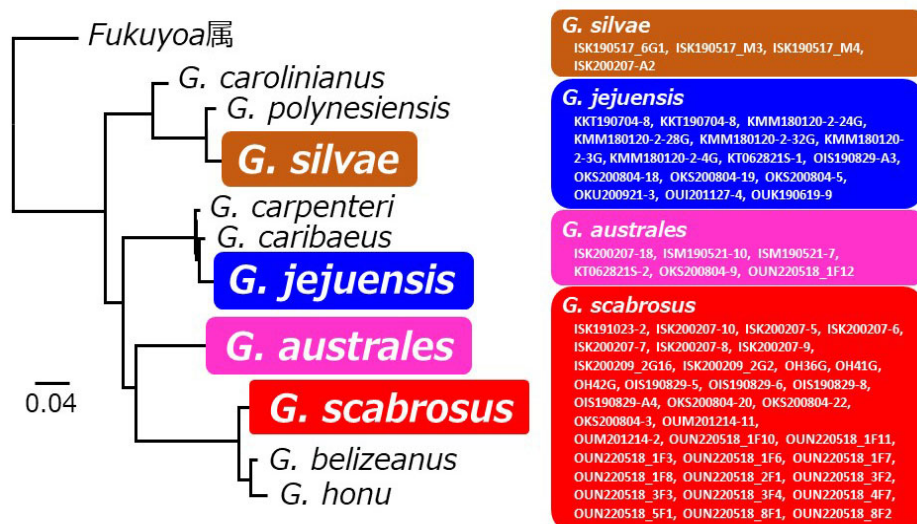


図1. *Gambierdiscus*属各種系統型および新規株の18S rDNA V8-V9領域に基づくRAxMLを用いて作成したML系統樹

さらに、沖縄県沿岸海域ならびに高知県沿岸海域より、89種の海藻試料を採取し、これらの海藻に付着している微細藻画分から抽出したDNAを、18S rDNA V8-V9領域を解析対象とするメタバーコーディングに供したところ、既報の5種/系統型に加えて、これまで本邦にて発生の報告が無い熱帯性の *Gambierdiscus*

*caribaeus*の発生が明らかとなった。さらに、過去に世界的も報告例が無い4種の新奇種 (*Gambierdiscus* sp. Clades II-1、 II-2、 II-3、 VI) が発生することも明らかになった (図2) (Funaki et al. 2022a)。

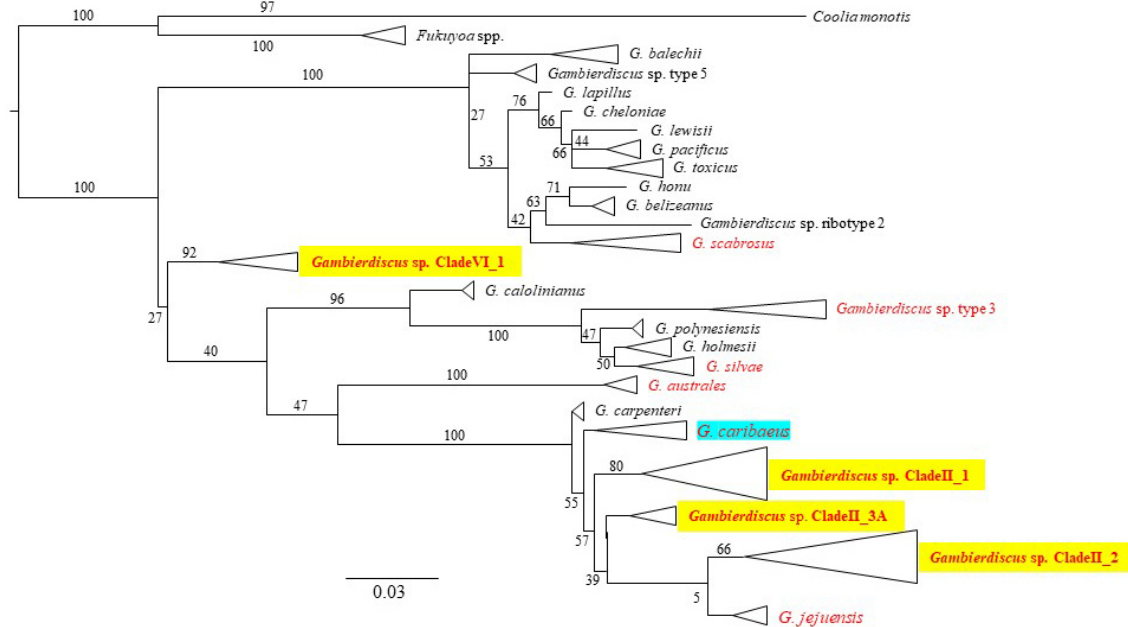


図2. 18S rDNA V8-9領域を解析対象とするメタバーコーディングによる本邦沿岸域にて発生する*Gambierdiscus*属藻類の多様性(最尤法により系統樹を作成)

次に、得られた新規株を用いて大量培養を行い、これより得られた藻体試料 (>70,000 cells)をSandwich ELISA法 (Tsumuraya et al. 2018)に供した結果、抗CTX1B抗体を用いて*G. silvae* ISK1905176G1株、ISK190517M4株および*G. scabrosus* OH42G株からCTX1Bが、抗CTX3C抗体を用いて*G. silvae* ISK190517M4株からCTX3Cがそれぞれ検出された。本結果に関連して、*G. silvae* ISK190517M4株からは、LC-MS/MSにより既知のCTXsは検出されなかった一方で、CTXsの部分構造と思われる物質を保有している可能性があり (内田、私信)、さらに本株から抽出した脂溶性画分は、マウスに対して強い経口毒性を示すことから (Funaki et al. 2022b)、本株は新規なCTXs関連化合物を産生し、これがシガテラ中毒の発生に関与している可能性が考えられる。

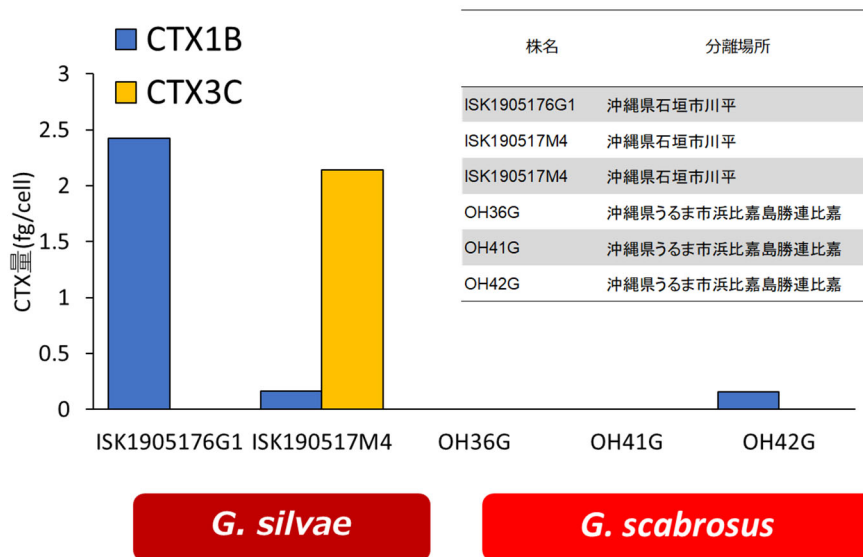


図3. Sandwich ELISA法による *Gambierdiscus* 属分離株の細胞内CTX含量

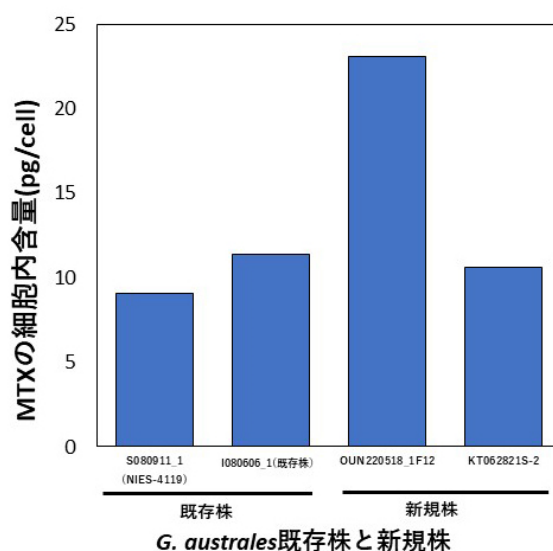


図4. *Gambierdiscus australes* 既存2株と、本研究プロジェクトにおいて新たに得られた *Gambierdiscus australes* 2株のMTX細胞内含量の比較

本研究において新たに得られた *Gambierdiscus* 属60株を培養することにより、5万細胞以上の培養藻体を調製し、これらをLC/MS/MS分析に供した。その結果、*G. australes* OUN220518_1F12株と同KT062821S-2株が、マイトトキシン(MTX)を産生し(図1と4)、前者の株はそれに加えて新規MTX類縁体も産生することが明らかとなった。新規株のMTX産生能に関して、*G. australes* OUN220518_1F12株の1細胞当たりのMTX含量(23.1 pg/cell)は、プロジェクト開始前に既に分離されていた *G. australes* I080606株(既存株)の含量(11.4 pg/cell)と比較して、2倍以上高かった(図4)。また、新規MTX類縁体の生産能に関しては、本プロジェクト研究にて得られた、他の *G. australes* 2株についても、その産生能が確認され

た。新規MTXの構造はLC/QTOF分析の結果、MTXより分子量が小さく、MS/MS分析によりMTXのC100-C142間に構造の違いがあることが推測された。

また増殖の遅い*G. silvae*等の株の増殖を改善するために、底生性有毒渦鞭毛藻として知られる*Prorocentrum lima* complex株の増殖を促進するトコロテン抽出液(Nishimura et al. 2020)を、*G. silvae*株に添加して培養試験を実施したが、増殖促進は見られなかった。そこで、*Gambierdiscus*属新奇系統型が付着していた海藻（ウスユキウチワやガラガラなど）よりアセトンを用いて海藻抽出液を調製し、これらが*G. silvae*株と*G. scabrosus*株の増殖に及ぼす影響について、培養試験により評価した。その際の培養条件として、ダイゴIMK/2培地(Nihon Pharmaceutical Co., Ltd., Japan、DSWベース、高知県室戸市にて採水した32~33 PSUの海洋深層水（DSW）を用いて調製した)を用いた。このIMK/2培地を、PP (polypropylene) キャップ付の50 mL容平底試験管（25 φ×150 mm、マルエム, Osaka, Japan）に分注し、これらを121℃にて30分間オートクレーブ滅菌した上で、上述した2株をそれぞれ接種し、GROWTH CHAMBER MLR-352 (PHC, Tokyo, Japan) 内にて25℃、光強度90–100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、明暗周期12h L:12h Dの各条件下で培養試験を行った。その結果、紅藻の1種であるガラガラから抽出した脂溶性画分の添加により、両株の増殖が有意に促進された(表1)。本結果により、*Gambierdiscus*属の異なる2種の増殖を促進したガラガラの抽出画分は、新奇系統型の増殖も促進することが期待された。

表 1. 各種海藻抽出液の添加が、*Gambierdiscus scabrosus* と、*G. silvae*2の増殖に与える影響

株	抽出液の種類	各添加濃度(mg/ml)		
		1.6	3.1	6.2
<i>G. scabrosus</i>	ウスユキウチワ			
	ガラガラ			118
	タマイタダキ			
<i>G. silvae</i>	ウスユキウチワ			
	ガラガラ			118
	タマイタダキ	120		

: 有意差なし : 有意に高い
 : 有意に低い **数字** : 非添加対照区の最大クロロフィル蛍光量を100とした際の相対値

さらに、本研究においてその存在を明らかにした新奇系統型の培養株の作製を目指し、また増殖の遅い*G. silvae*等の株の増殖を改善するために、*Gambierdiscus*属藻の発生時に海洋細菌を単離し、*G. silvae*無菌株の培養液にこれらの細菌を添加することにより、先に述べた培養条件下にて、その増殖を促進するか検討した。その結果、得られた192株の海洋細菌のうち、7株が本藻の増殖を有意に促進することが判明した。さらに、これらの細菌を、*G. scabrosus*の無

菌株の培養液に添加することにより、その増殖を促進するか検討した結果、いずれの細菌も、本種の増殖を促進しなかったことから、その作用は種特異的である可能性が示唆された。以上のことから、今回得られた細菌は、増殖の遅い*G. silvae*株の大量培養時に有用である可能性が示唆された。

(2) シガテラ魚類食中毒原因物質の分析手法ならびに標準物質製造手法の開発

シガテラ魚類食中毒原因物質を産生するとされる*Gambierdiscus* 属および沖縄県沿岸から収集したシガテラ魚類中に含まれるシガトキシン群の分析条件を検討した。*Gambierdiscus* 属が産生するシガトキシン群はK-L環において特徴的なプロダクトイオンを生じる。LC/QTOF分析において、In-source CID (ISCID) エネルギーを高くすることによりイオン源内でCTX群を開裂させ、CTX群に特徴的な部分構造と開裂を生じにくいナトリウムおよびカリウム付加イオンをモニタリングすることで網羅的に*Gambierdiscus* 属が産生するシガトキシン群を検出する手法を確立した(図5)。本法により、類似した構造を持つ類縁体についても特徴的なプロダクトイオンを抽出することで、CTX群の検索が可能となった(図6)。

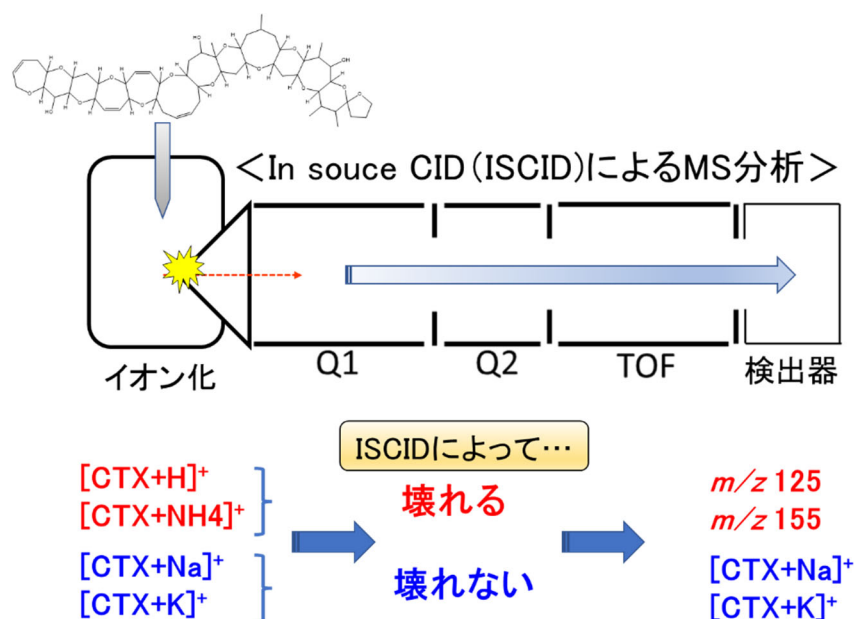


図5. In-source CIDによるシガトキシン群の分析法の確立

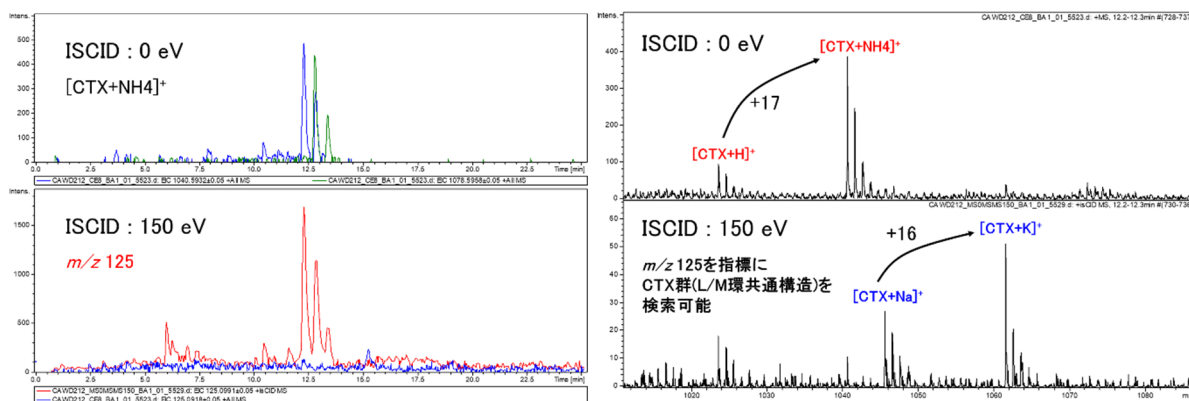


図6. In-souce CIDによる*Gambierdiscus* 属が産生するシガトキシン群の分析

(A) ISCID 0 eV分析のシガトキシン群アンモニウムイオン付加体の抽出イオンクロマトグラム, (B) ISCID 150 eV分析のシガトキシン群プロダクトイオンの抽出イオンクロマトグラム, (C) ISCID 0 eV分析のCTX3C MSスペクトル, (D) ISCID 150 eV分析のCTX3C MSスペクトル

沖縄県沿岸から収集したシガテラ魚類（26検体）について筋肉部位と肝臓に分け、LC/MS/MSによりCTX群の分析を行ったが、高毒化した筋肉部位の試料が得られなかったため、高感度なELISA法でCTX群を分析した。CTX1B抗体反応等量で0.1 ng/g を超えた試料は筋肉部位においてイッテンフエダイ 2 検体、バラフエダイ1 検体であった。肝臓部位においてはバラハタ1検体、イッテンフエダイ1検体、ドクウツボ3検体であった。ドクウツボの肝臓は本研究内で収集した試料のうちCTX1B抗体反応等量0.66-4.70 ng/gでCTX群を検出した。ELISAでCTX群が検出された試料の一部を、LC/MS/MS分析用の前処理および濃縮し、マウス神経芽細胞腫細胞（Neuro2A）毒性試験を実施した。25倍濃縮となるLC/MS/MS分析用の前処理および濃縮操作を行うことでELISAによりFDAのCTX1B基準値0.01 ng/gの低濃度試料においてもNeuro2A細胞毒性試験でCTX群の検出が可能であることが示唆された（表2）。

表2. シガテラ魚類のELISAおよびNeuro2A細胞毒性試験によるCTX群分析

#	魚種	CTX1B-ELISA試験 CTX1B抗体反応等量(ng/g)		Neuro2A細胞毒性試験 CTX3C活性等量 (ng/g)	
		筋肉部位	肝臓	筋肉部位	肝臓
TTP-CFP-001	コクハンアラ	0.01	N.D.	0.1	未試験
TTP-CFP-002	バラハタ	0.09	0.06	1.2	0.7
TTP-CFP-004	マダラハタ	0.05	0.03	0.3	未試験
TTP-CFP-011	コクハンアラ	0.01	0.01	0.1	0.2
TTP-CFP-022	イッテンフエダイ	0.90	0.70	1.2	未試験
TTP-CFP-023	バラフエダイ	0.01	N.D.	0.1	未試験
TTP-CFP-024	バラハタ	0.20	0.40	1.8	未試験

次にMTXを産生する*G. australes*、CTX群抗体と反応を示す*G. silvae* および*G. scabrosus*の抽出液についてNeuro2A細胞毒性試験を実施し、ウアバイン/ベラトリジン（0/V）添加有無の細胞毒性試験の結果を表3に示す。*G. australes*は0/V添加有無どちらも顕著な毒性を示さなかった。一方で*G. silvae*は0/V添加区のみで毒性を示し、CTX群と類似した活性を示した。*G. scabrosus*は0/V添加有無どちらも細胞毒性を示すことから、強い細胞毒性物質を産生することが明らかになった。Neuro2A細胞毒性試験を指標にCTX群と同様の活性を持つ*G. silvae*の抽出液を精製し、活性の強い画分をLC/QTOF分析したが既知のCTX群やCTX群と類似するポリエーテル化合物は検出されなかった。

表3. *Gambierdiscus*属抽出液のNeuro2A細胞毒性試験

株名	属種	1000倍希釈		10000倍希釈	
		O/V有	O/V無	O/V有	O/V無
S080911_1	<i>Gambierdiscus australes</i>	△	×		
I-080606-1	<i>Gambierdiscus australes</i>	×	×		
KW070922-1	<i>Gambierdiscus scabrosus</i>	×	△		
OH42G	<i>Gambierdiscus scabrosus</i>	○	○	△	×
ISK190517M3	<i>Gambierdiscus silvae</i>	○	×	△	×
ISK190517M4	<i>Gambierdiscus silvae</i>	○	×	○	×

○：強い毒性、△：弱い毒性、×：毒性なし

標準物質製造手法の開発に必要となるMTXの精製原料を確保するため、MTXの生産が確認されている*G. australes*既存株を用いて培養条件を検討した。100mLフラスコ、3Lカブ型フラスコ、20Lコンテナと順次拡大し、生育とMTXの産生を確認した。20Lコンテナを3台連結し、1/2IMK海水培地を循環させた大量培養（100 L 規模）を検討した。25℃でコンテナ3連・100Lの培養では、各培養槽に $1.3 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ cellsの細胞を播種したのち6週間培養した。順調に生育した際には、回収藻体中に約6 mgのMTXが含まれていた。コンテナ1個当りのMTX収量としては、静置培養で約700 μ g、循環培養では約2mgとなった。なお、本藻とは異なる微細藻のコンタミネーションが起こった際には極端にMTX含量が低くなった。これらの培養により、標準物質製造の検討に必要なミリグラムオーダーの原料を得ることができた。コンタミネーションを防ぐ培養法を検討し、300cm²培養フラスコによる静置培養で*G. australes*既存株のMTX産生量は3Lカブフラスコと同等であった。300cm²培養フラスコ6個で20Lコンテナに相当し、フラスコを重ねることで効率的な培養が可能であり、フラスコの再使用によってコストや手間も削減できることが明らかになった。同様の培養手法は*G. silvae*にも適用でき、Neuro2A細胞毒性試験や活性の精製に用いられた。

online-SFE-SFC装置（Nexera UC，島津製作所）を活用してAZA分離条件をベースに、シガテラ魚類食中毒原因物質の分析ならびに標準物質製造手法を検討した。提供株*G. australes*培養物(I-20200929-No.1)中のMTX類縁体の分析条件をカラム(UC-RP:オクタデシル基+極性官能基, UC-Diol:ジオール基, DCpak PBT:ポリブチレンテレフタレート基)と溶媒(SFCO₂とMeOH, MeOH (20mM NH₄OAc))の組み合わせで検討した。抽出時間5分、モディファイヤー初期濃度5%から40%のリニアグラジェント溶離において、多数の夾雑ピークが認められた。200～800nmにおけるDADとMSでのモニターから、目的物と考えられるピーク近傍で夾雑物の影響を受けにくいと認められたのは、UC-RPカラムによる分離であることが分かった。目的物の単離確認にまでは至らなかったが、AZA精製同様にonline-SFE-SFC装置を用いた洗浄メソッドで色素や脂肪酸類の除去を行うことで、目的物純度を高められる可能性が示された。

MTXを産生する*G. australes*を大量培養した藻体を原料にMTXの標準物質製造技術を確立した。*G. australes*の凍結乾燥物から二酸化炭素の超臨界流体によるMTX抽出は、をメタノールを共溶媒にしてもMTXの抽出効率が約10%以下であり、溶媒抽出が適していた。含水アセトニトリルで藻体からMTXを抽出し、冷凍することでアセトニトリル層と水層に分離した。水層にMTXが含まれ逆相ODS固相抽出カラムに吸着させてMTXを抽出した。次にDiol固相抽出カラム、フェニル固相抽出カラムで精製した。次にゲルろ過クロマトグラフィーに供し、逆相ODSカラムによるHPLC精製することで高純度なMTXが得られた。¹H-NMR(図7)の結果から定量NMRに使用できるピークを選定し、MTXを精製するための標準手順書(別添2:マイトトキシン精製手順書)を作成した。

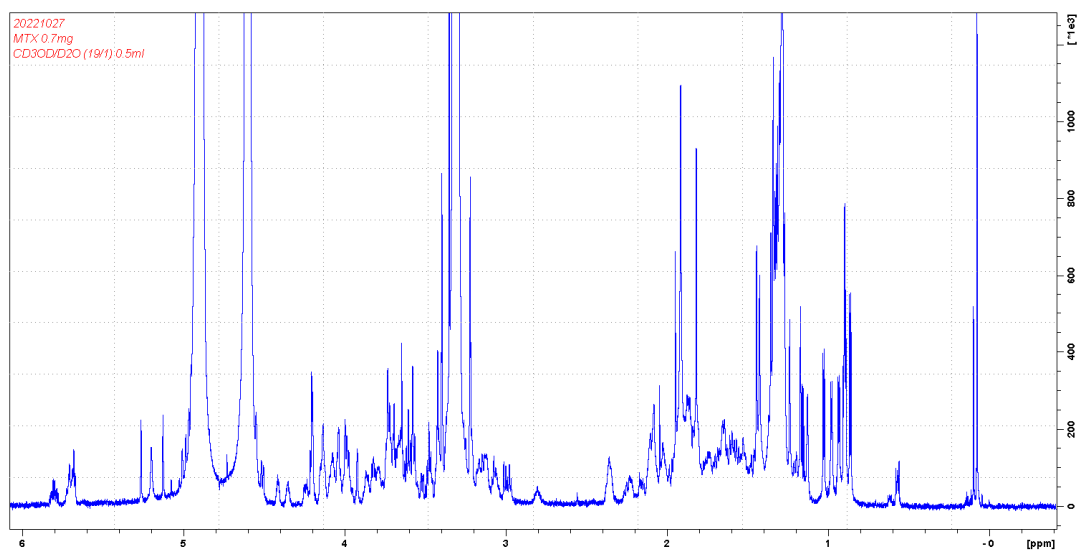


図7. 精製したMTXの¹H-NMR スペクトル

(エ) 研究成果の活用における留意点

本研究によりマイトトキシン、あるいはその新規類縁体を産生することが明らかとなった*G. australes*株や、新規CTXs関連化合物を産生する可能性を有する*G. silvae*株については、本プロジェクト終了後も、継代・維持することが重要と考えられるが、担当学生が常時入れ替わる大学でこれを行うことは困難であるため、これらの株を国立環境研究所などの微細藻保存機関へ寄託する可能性について検討する。

online-SFE-SFC装置による精製法では、MTXが水溶性化合物であることから本法が本MTX類縁体の抽出精製に適しているか、化合物が壊れないか等慎重に検討する必要がある。

精製原料用の多量培養時のコンタミネーションについては、培地に海水を用いることで基本的に大きな問題とならないことが明らかになった。また、多量培養を行う際には、培地の組成や温度等の条件について、目的物質の収量も含めて細かい検討をしておくことが望ましい。

MTXの分析用標準品が必要になった場合は作成した精製手順書をもとにMTXを精製し、得られた標準物質原料について試薬メーカー等への提供を検討する。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

本研究目標として、「国内の沿岸域から原因物質（シガトキシン類・マイトトキシン類）産生藻類の分離を目指し、*Gambierdiscus*属を中心に年5株以上、5年間にわたり計25株以上を海域から分離して培養株を確立し、種の同定を行うこと」としていたが、本研究では計60株の新規な分離株を確立し、それらを同定することにより、*G. scabrosus* 35株、*G. jejuensis* 15株、*G. silvae* 6株および*G. australes* 4株から構成されることが明らかにした。また、「シガテラ魚類食中毒原因物質（シガトキシン類、マイトトキシン類）を生産する微細藻について、2株以上の培養株を確立する」との目標に関しては、LC-MS/MS分析によりマイトトキシンを産生する*G. australes* 2株を獲得することが出来、そのうち1株は既存株よりも1細胞当たりのマイトトキシン含量が高いことを明らかにした。さらに新規マイトトキシン類縁体を生産する株を3株獲得できた。よって、当初の研究目標を達成することが出来た。その一方で、シガトキシン類を生産する株を得ることが出来なかったため、これを得ることが今後の課題である。

前記1-(オ)と同様に、online-SFE-SFC装置（Nexera UC, 島津製作所）を活用した抽出分離精製法では本機に特化したメソッドや精製の実施となることが問題である。他社の超臨界流体抽出及びクロマトグラフ装置はオンラインでないものが多く、本機の手法を移管して使用することは難しいと考えられる。

また、本研究によりマイトトキシンの精製方法は確立されたが、*Gambierdiscus*属の培養藻体からシガトキシン群の精製方法も確立も今後の課題である。

<引用文献>

Hiroshi Funaki, Chetan Chandrakant Gaonkar, Takafumi Kataoka, Tomohiro Nishimura, Kouki Tanaka, Ippei Yanagida, Shouta Abe, Haruo Yamaguchi, Masao Adachi (2022a)

Horizontal and vertical distribution of *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae) including novel phylotypes in Japan identified by 18S rDNA metabarcoding. Harmful Algae 111, 102163. DOI: 10.1016/j.hal.2021.102163.

Hiroshi Funaki, Tomohiro Nishimura, Takuya Yoshioka, Taichi Ataka, Yuta Tanii, Kana Hashimoto, Haruo Yamaguchi, Masao Adachi (2022b)

Toxicity and growth characteristics of epiphytic dinoflagellate *Gambierdiscus silvae* in Japan. Harmful Algae 115, 102230. DOI: 10.1016/j.hal.2022.102230.

Takeshi Tsumuraya, Takeshi Sato, Masahiro Hiram, Ikuo Fujii (2018)

Highly sensitive and practical fluorescent sandwich ELISA for ciguatoxins. Analytical Chemistry 90, 7318-7324. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b00519.

4 研究成果の発表

別添のとおり。

5 研究期間中に生じた問題、今後の課題等

1) アザスピロ酸に関する研究

日本沿岸域から検出された*A. poporum* 種内系統群のうちA2, B, C1はアザスピロ酸群の規制値が設けられているAZA2が検出された。C1は細胞あたりのAZA2平均産生能

がA2, Bよりも4-7 倍高く、最大で139 fg/cellの高いAZA2産生能を有する株が得られた。そのためC1はアザスピロ酸による二枚貝毒化の高リスクな種内系統群であると考えられた。アザスピロ酸の監視体制の構築にあたって、*A. poporum* が出現する海域において、最大の出現密度や出現時期、種内系統などを明らかにする必要があると考えられる。

2) シガテラ魚類食中毒に関する研究

本研究における、メタバーコーディングを用いた網羅的群集組成解析により、本邦沿岸域には既報の*Gambierdiscus*属5種/系統型に加えて、これまで本邦にて発生が報告が無い熱帯性の*Gambierdiscus caribaeus*や、過去に世界的にも報告例が無い4種の新奇種が発生していることが明らかとなった。これらの種がCTXsを産生し、本邦沿岸域における魚類の毒化を引き起こしている可能性が考えられるため、今後はこれらの培養株を作成し、これらのCTX群産生能を評価する必要がある。その際に、本研究で開発した本属藻の増殖を促進する海藻抽出液や、海洋細菌を用いることにより、効率良くこれらの培養株が確立され、その毒分析が行われることが期待される。また、前述したように*G. silvae* ISK190517M4株は、マウスに対して強い経口毒性やシガトキシンと同様のNeuro2A細胞毒性を示すが既知のCTX群が検出されないことから新規なCTX群関連化合物を産生する可能性が示唆されている。その毒分析を行うためには大量の細胞が必要となるが、*G. silvae* 株の増殖は遅いため、今後は本研究にて開発した海藻抽出液や海洋細菌を用いることにより、効率的にその大量培養を行い、これにより得られる藻体を用いて、その毒の同定、さらにはそのシガテラ中毒への関与について明らかにされることが期待される。